Ideale und reale Eiweisslösungen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

genehmigt von der Philosophischen Fakultät

der Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Berlin

Von

Robert Havemann

aus Bielefeld

Tag der Promotion: 16. Oktober 1935

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 1934

Akademische Verlagsgesellschaft m. b. H.

Leipzig 1935

384

Gedruckt mit Genehmigung der Philosophischen Fakultät
der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

Referenten: Prof. Dr. M. Bodenstein
Prof. Dr. W. Schlenk

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus „Zeitschrift für physikalische Chemie", Abteilung A
Band 174, Seite 199—221. 1935
Akademische Verlagsgesellschaft m. b. H. in Leipzig

Lässt man homodisperse Quarzsuspensionen in Eiweisslösungen sedimentieren, so beobachtet man ein Maximum des Sedimentvolumens in isoelektrischen Lösungen. Durch Einführung der Sedimentvolumendifferenz (Δ SV) wird die bisher übliche Methode des einfachen Sedimentvolumens zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes wesentlich verfeinert. Misst man Δ SV in Ovalbumin- und Serumalbumin-Quarzsuspensionen in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration, so tritt oberhalb einer bestimmten Konzentration eine Abhängigkeit des Δ SV-Maximums von der Proteinkonzentration auf. Aus dem p_H-Gang der Eiweisslösungen ergibt sich oberhalb dieser Grenzkonzentration eine Konzentrationsabhängigkeit des isoelektrischen Punktes.

Aus dieser Bestimmung des isoelektrischen Punktes sowie aus der Änderung der kataphoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der Quarz-Eiweissuspensionen, — sämtlich in Abhängigkeit von der Eiweisskonzentration, sowie schliesslich nach Feststellung der Adsorptionssättigung findet sich, dass ein Wechselwirkungseffekt zwischen den isoelektrischen Proteinmolekülen auftritt, sobald eine bestimmte Konzentrationsgrenze überschritten ist. Die Art dieser Wechselwirkung lässt sich auf Grund jenes Wechselwirkungspotentials auf dem Boden der strengen Elektrolyttheorie der Eiweisslösungen vollständig deuten. Aus diesem Wechselwirkungspotential lassen sich alle besonderen, hier aufgetretenen Erscheinungen verstehen, dazu auch gewisse bisher ungedeutete.

Man hat demnach Eiweisslösungen, in denen merkliche Wechselwirkungskräfte vorhanden und zu berücksichtigen sind (reale Lösungen) von solchen zu unterscheiden, wo sie fehlen (ideale Lösungen).

I. Einleitung.

Nachdem gezeigt worden war, in welchem speziellen Sinne Eiweisslösungen als Elektrolytlösungen aufzufassen sind[1]), musste sich sofort die Frage nach den Wechselwirkungen unter den gelösten Teilchen erheben. Für eine derartige Untersuchung ist zunächst von Bedeutung, dass im Eiweissmolekül schwache bis mittel-

[1]) Ettisch und Schulz, Biochem. Z. **239** (1931) 48. Schulz und Ettisch, Z. physik. Chem. (A) **164** (1933) 97. Ettisch und Schulz, Biochem. Z. **265** (1933) 338, 370. Ettisch, G., Pariser Vortrag, erscheint demnächst im J. Chim. physique.

starke (unter Umständen auch starke) Säuren und Basen in der Vielzahl und in besonderer Anordnung enthalten sind. (Ampholyt höherer Ordnung.) Die Dissoziationskonstanten dieser Säuren und Basen sind jetzt grundsätzlich bestimmbar, und damit grundsätzlich auch der Dissoziationszustand des Moleküls bei jedem p_H. Bei willkürlicher Umgebung des gelösten Eiweissteilchens müssen aber genaue Angaben über die in Frage stehenden Verhältnisse schwierig werden. Für die eiweissfreie Lösung würde alsdann bereits die Aktivität an die Stelle des Molenbruchs im Ausdruck für die Potentialfunktion getreten sein. Das Hinzufügen von Proteinmolekülen zu solcher Lösung muss aber die Wechselwirkungseffekte derartig vermehren, dass auf den ersten Blick eine quantitative Auflösung hier gegenwärtig noch aussichtslos erscheinen möchte.

Für die Versuche zu einer experimentellen Klärung dieser Frage weist aber gerade die besondere Natur des Eiweissmoleküls auf gewisse einfachere Zustände hin, von denen aus man weiter vordringen könnte. Die besondere Natur als gleichzeitige Säure und Base von schwachem bis mittelstarkem Charakter wird chemisch dargestellt durch die entsprechenden Gruppen ganz bestimmter, elektrochemisch feststellbarer Aminosäuren des Moleküls. Diese Eigenschaft bedingt — in Abwesenheit von Salzen — die Existenz eines p_H-Wertes, bei dem gleichviel dissoziierte Gruppen des „Säureanteiles" wie des „Basenanteiles" im Molekül gezählt werden. Dieses befindet sich dann in seinem isoelektrischen Punkt (abgekürzt geschrieben: IP)[1]. Die Verhältnisse im Innern der Lösung werden in diesem Fall erheblich einfacher. Das Molekül, in genügendem Abstand, also bei sehr geringer Konzentration, betrachtet, besitzt dann keine freie elektrische Ladung. Abgesehen von geringfügiger Hydratation, können hier auch keine chemischen Wechselwirkungen zwischen dem Eiweissmolekül und der Umgebung auftreten. Das p_H^* bleibt konstant bei der Vermehrung der Eiweissteilchen. Die Zahl der in der Lösung anwesenden wenig-atomigen Ionen wird also durch das Hinzufügen des Proteins nicht verändert, solange nicht irgendwelche Zusatzkräfte auftreten. Weiterhin liegt das p_H^* in der Regel bei solchen $[H^+]$[2], wo auch für die eiweiss- und salzfreie Elektrolytlösung das Mass der

[1]) Alle Grössen, die für diesen IP gelten, z. B. p_H-Wert usw., werden im Verlaufe der Arbeit zwecks Abkürzung und Hervorhebung mit einem * versehen, z. B. p_H^*. [2]) Wir bezeichnen hier, wie vielerorts üblich, die Konzentrationen mit [ ], die Aktivitäten mit ( ).

Wechselwirkung der Ionen unter die Grenze des Messbaren fällt und daher die Konzentration im Ausdruck für das thermodynamische Potential erscheinen darf. Unter solchen Umständen kann man hier allein die Wirkungen untersuchen, die die Veränderung der Zahl der Proteinmoleküle auf alle davon abhängigen Erscheinungen ausübt. Man wird damit in den Stand gesetzt sein, auszusagen, von welcher Proteinkonzentration ab — unter sonst einfachsten Verhältnissen — das thermodynamische Potential der Lösung sich nicht mehr nur nach Konzentration der Teilnehmer bestimmt, sondern die Aktivitätspotentiale noch hinzutreten müssen. Diese bedeutungsvolle Konzentrationsgrenze wird sich an allen jenen Effekten zeigen, die geeignet sind, den IP einer Proteinart zu bestimmen. Denn der IP wird, das kann man voraussagen, verschoben werden müssen. In geringen mittleren Abständen, also bei hinreichend hohen Konzentrationen, kann das isoelektrische Eiweissmolekül nicht mehr als ladungsfrei angesehen werden. Vielmehr wird nunmehr den elektrischen Kräften Rechnung zu tragen sein, die dann auch hier zwischen den COO^-- und den NH_3^+-Gruppen usw. der verschiedenen Proteinteilchen auftreten müssen und den Ausdruck für das Potential verändern. Solche konzentrationsabhängigen Verschiebungen des IP zu zeigen, ist der Gegenstand der folgenden Arbeit. (Der Nachweis der Wirkung auf die wenigatomigen Elektrolyte musste aus äusseren Gründen einer späteren Arbeit überlassen bleiben.)

II. Experimenteller Teil.

1. Die Methode.

A. Allgemeine Bemerkungen.

Das Verhalten von Suspensionen gröberer Teilchen bezüglich des Maximums ihres Sedimentvolumens (abgekürzt: SV) in verschiedenen Lösungen ist besonders geeignet, als empfindliche und sehr einfache Methode zur Festlegung des IP zu dienen.

Besonders eingehend hat sich A. v. Buzagh[1]) mit der Veränderlichkeit des SV von gröberen Suspensionen unter verschiedenen Umständen befasst. Er fand, dass das SV einen Maximalwert erreicht, wenn vom Phasengrenzpotentialsprung: suspendierter Körper—Lösung ein bestimmter Teil, die sogenannte „ξ-Potentialdifferenz" verschwindet. Nun haben die Arbeiten von Ettisch und Zwanzig[2]),

[1]) v. Buzagh, A., Kolloid-Beitr. **32** (1930) 114. [2]) Ettisch und Zwanzig, Z. physik. Chem. (A) **147** (1930) 151; **160** (1932) 385.

Mooney[1]), Reichardt[2]), Köhler[3]) gezeigt, dass die Theorien über diesen Potentialsprung den Erfahrungen nicht genügen[4]). Komagata[5]) konnte erst kürzlich weitere Ausführungen hierzu beisteuern. Für unseren Fall kommt es aber weniger auf eine Theorie an, als auf eine beobachtbare, reproduzierbare Erscheinung, nämlich das Aufhören der Wanderung suspendierter Teilchen in einem elektrischen Feld sowie die Ursache hiervon. Man wird die Bedingung so fassen können: Derjenige Teil des gesamten Potentialsprungs muss verschwinden, der jeweils zwischen der äussersten Oberflächenschicht des beweglichen Teilchens und dem Innern der Lösung besteht. Dieser Potentialsprung, Teil eines thermodynamischen Potentialgradienten, liegt also vollkommen in der Flüssigkeit. Damit ist gesagt, dass das Verschwinden des „ξ"-Potentialsprunges notwendig und hinreichend ist für den Eintritt des Extremwertes von SV. Hinreichend wäre aber auch das Verschwinden der gesamten Potentialdifferenz (ε-Potentialsprung) an der Grenze; denn dann annulliert sich selbstverständlich hier auch „ξ"[6]). Dieser Fall ist hier von Bedeutung, wo ein „ξ"-Potentialsprung kaum exakt definierbar ist[7]).

Das Maximum des SV für den charakterisierten Potentialwert Null ist von ausserordentlicher Schärfe. Dort, wo sich nur sehr geringe kataphoretische Wanderungsgeschwindigkeit (abgekürzt: kWG) findet (also Potentialdifferenzen von nur einigen Millivolt vermutet werden können), wird bereits eine starke Erniedrigung des SV beobachtet. Mit weiter zunehmender kWG nähert sich der SV-Wert schliesslich einer Grenze, die einer wesentlich dichteren Packung der Teilchen entspricht.

---

[1]) Mooney, J. physic. Chem. **35** (1931) 331. [2]) Reichardt, Z. physik. Chem. (A) **154** (1931) 333. [3]) Köhler, Z. physik. Chem. (A) **157** (1932) 113. [4]) Die Einwände von Bull (Kolloid-Z. **66** (1934) 20), sind zum Teil schon in der Arbeit von Ettisch und Zwanzig aufgeworfen und erörtert, zum Teil treffen sie nicht den Gegenstand. Sie sind auch nicht frei von Widerspruch. Auch die Versuche von Daniel, J. Gen. Physiol. **16** (1933) 457 können nicht als beweisend bezeichnet werden. Bikermann (Z. physik. Chem. (A) **117** (1934) 209) teilte unter anderem mit, wann unter bestimmten Bedingungen der von Ettisch und Zwanzig vorausgesagte und von Mooney gefundene $u\,(E)$-Effekt bei der Kataphorese eintreten müsste. Es kann hier unerörtert bleiben, ob nicht in dem von Ettisch und Zwanzig untersuchten Falle die Bedingungen für den Eintritt jenes Effektes noch günstiger lagen als in demjenigen, den Bikermann voraussetzte. [5]) Komagata, Sc. Res. El. Lab., Tokyo Nr. 362. [6]) Um der Kürze des Ausdruckes willen behalten wir die „ξ"-Bezeichnung bei, möchten sie aber stets in dem angegebenen Sinne verstanden wissen. [7]) Siehe hierzu Ettisch, G. und Schulz, G. V., Biochem. Z. **265** (1933) 365f.

Freundlich und Abramson[1]) untersuchten die kWG von in Eiweisslösungen suspendierten Quarz- (und auch Zink-) Teilchen. Sie fanden, dass eiweissumhüllte Quarzteilchen von bestimmten, sehr niedrigen Eiweisskonzentrationen an im elektrischen Felde hinsichtlich ihrer Bewegung vollkommen den gelösten Eiweissteilchen gleichen, die Svedberg und Tiselius[2]) kataphoretisch wandern liessen. Sie schlossen daraus, dass die suspendierten Quarzteilchen, die eine Eiweisshülle vollkommen umschliesst, sich wie die einzelnen Eiweissmoleküle selbst verhielten. Dieser Schluss, den sie aus der von ihnen errechneten Übereinstimmung ihrer Werte mit denen von Svedberg und Tiselius glaubten ziehen zu können, hält jedoch strenger Prüfung nicht stand. Von noch anderem abgesehen, ist hier nicht berücksichtigt, dass bei der „Kataphorese" im U-Rohr nicht allein die Bewegung der Proteinmoleküle gegenüber dem Lösungsmittel, d. h. allein ihre Überführungszahl, gemessen wird, sondern sich die beobachtete Wanderung aus Überführung und Elektroosmose der gesamten Lösung zusammensetzt.

In gleicher Weise, wie man in der Messung der kWG der von Eiweiss umhüllten Quarzteilchen in Abhängigkeit vom p_H eine Methode zur Ermittlung des ε-Potentialwertes Null und daher zur Bestimmung des IP besitzt, musste auch die Ermittlung des SV-Maximums von Quarzsuspensionen in Eiweisslösungen von verschiedenem p_H diese Möglichkeit bieten. Da die sogenannte „Hydratation" der Proteine bei Aufladung in Wirklichkeit eine vergrösserte Raumversperrung[3]) der Moleküle, veränderte Wasseranlagerung, also grundsätzlich nicht nur irrelevant, sondern physikalisch unmöglich ist, da ferner erfahrungsgemäss[4]) die Besetzung adsorbierender Flächen mit Proteinmolekülen wenig dicht zu sein pflegt, war derartiges schon aus v. Buzaghs Arbeiten vorauszusagen. Freundlich und Lindau[5]) bestätigten es durch Versuche.

Eine wesentliche Voraussetzung bei allen derartigen Methoden zur Bestimmung des IP ist, dass der in Betracht kommende Potentialsprung: Glas + Eiweiss, bzw.: Quarz + Eiweiss = Eiweisslösung nur von solchen an der Grenzfläche adsorbierten Molekülen bestimmt wird, um die es sich gerade handelt. Ferner müssen

---

[1]) Freundlich und Abramson, Z. physik. Chem. **128** (1927) 25; **133** (1928) 51. [2]) Svedberg und Tiselius, J. Amer. chem. Soc. **48** (1926) 2272. [3]) Ettisch und Schulz, loc. cit. (bes. Biochem. Z. **239** (1931) 48). [4]) Lecomte du Nouy, Surface equilibria etc. New York 1926. S. 77. [5]) Freundlich und Lindau, Biochem. Z. **234** (1931) 170.

die adsorbierten Moleküle dieselben besonderen Eigenschaften aufweisen, wie die Moleküle im Innern der Lösung. Es ist einleuchtend, dass gerade diese Voraussetzung niemals vollständig, sondern immer nur angenähert erfüllt sein kann. Das ist thermodynamisch zu fordern, sowie auch kinetisch einleuchtend. Die Adsorption geht mit Energieverlust für das Molekül vor sich, im Felde der Adsorptionskräfte erfährt der dort gelegene Molekülteil zum mindesten eine Polarisation, die unter Umständen von weiterer Bedeutung sein kann. Ist also über die Grösse solcher Veränderungen nur von Fall zu Fall etwas auszusagen und diese hier am Quarz augenscheinlich nicht erheblich, so sei doch daran erinnert, dass — allerdings an anderen Grenzen — RAMSDEN[1]), J. LOEB[2]), v. MUTZENBECHER[3]) u. a. merkliche Veränderungen bei der Adsorption mitgeteilt haben.

B. Die Technik der SV-Versuche.

Das zu unseren Versuchen verwendete Quarzpulver war ein reines, eisenfreies Präparat der Firma J. Riedel und de Haen. Es wurde etwa 1 kg in Portionen je 6 Stunden in der Kugelmühle gemahlen. Durch fraktionierte Sedimentation liessen sich daraus etwa 100 g einer homodispersen Fraktion von Teilchen mit etwa 8 bis 10 μ Durchmesser gewinnen. Wir wählten Teilchen gerade dieser Abmessungen, weil der SV-Effekt bei ihnen noch genügend gross ist und die Sedimentationszeit einen erträglichen Wert besitzt. Das Pulver wurde nach den Versuchen zwecks Reinigung von adsorbiertem Eiweiss stets in Königswasser gekocht, in destilliertem Wasser ausgewaschen und vor dem Gebläse schwach geglüht. Als Sedimentationsgefässe dienten durch Glasstopfen verschliessbare Standzylinder von etwa 25 cm^3 Inhalt und etwa 1 cm^2 möglichst übereinstimmendem Querschnitt. Sie waren von 1 bis 20 cm in $^1/_{10}$ cm graduiert; die Hundertstel liessen sich noch schätzen. In jedes Röhrchen wurden genau 5·0 g Quarz eingewogen.

In jedes Röhrchen wurde die jeweils benötigte Menge destillierten Wassers gegeben. Bevor die Eiweisslösung aufgefüllt wurde, bestimmten wir das SV der eingewogenen Quarzmenge in reinem Wasser in jedem Röhrchen einzeln. Dann wurde das Sediment wieder aufgeschüttelt und die berechnete Menge Eiweisslösung hinzugefügt. Die Differenz zwischen dem nun erhaltenen SV und dem in reinem Wasser, d. h. die Zunahme des SV in jedem einzelnen Röhrchen, ist eine Grösse, die ungleich geringer — und zwar nur innerhalb der Ablesegenauigkeit — von

[1]) RAMSDEN, Z. physik. Chem. **47** (1904) 336. [2]) LOEB, J., Die Eiweisskörper. Springer 1924. [3]) v. MUTZENBECHER, Biochem. Z. **273** (1931) 113.

den Fehlern belastet ist, die bei dem Wert des gesamten SV durch ungenaue Einwage und durch den nicht ganz gleichen Durchmesser der Sedimentationsgefässe hervorgerufen werden[1]). Das SV einer Suspension ist natürlich in engeren Gefässen grösser als in weiteren. Wir nennen diese SV-Differenz, den ΔSV-Wert. Die von uns hier ausschliesslich angegebenen ΔSV-Werte beziehen sich, wie schon erwähnt, auf 5 g Quarz in Sedimentationsgefässen von 1 cm² Querschnitt. Das SV von 5 g Quarz in reinem Wasser beträgt in diesen Gefässen etwa 3·4 cm.

Bezüglich der ΔSV-Werte ist hier noch folgendes zu bemerken: Die Sedimentvolumina erreichen erst nach sehr langer Zeit einen konstanten Endwert, d. h. die Sedimente sintern (wohl infolge geringer Erschütterungen) immer noch mehr zusammen. Die Geschwindigkeit dieses Fortschreitens der Sedimentation ist der SV-Differenz proportional. D. h. mit zunehmendem Volumen nimmt die Stabilität des Sediments ab. Während der Sedimentation beobachtet man, dass die Teilchen mit dem kleinsten Grenzflächenpotential am schnellsten sedimentieren. Fig. 1, die zwei gleiche Versuchsreihen mit Eieralbumin unter gleichen äusseren Bedingungen wiedergibt, und die sich nur hinsichtlich der Sedimentationszeit und eventueller Erschütterungen der Unterlage unterscheiden, lässt das geschilderte Verhalten der Sedimente deutlich erkennen. Man sieht, dass die ΔSV-Kurve in demselben Masse flacher wird, wie die SV-Werte selbst bei der einen Kurve kleiner sind, ohne dass der prinzipielle Verlauf eine Veränderung erfährt. Die Kurven lassen sich durch Veränderung des Masstabes zur Deckung bringen. Die Lage des Maximums bleibt exakt erhalten. Nur auf die Ermittlung dieser Maxima kam es uns in dieser Arbeit an.

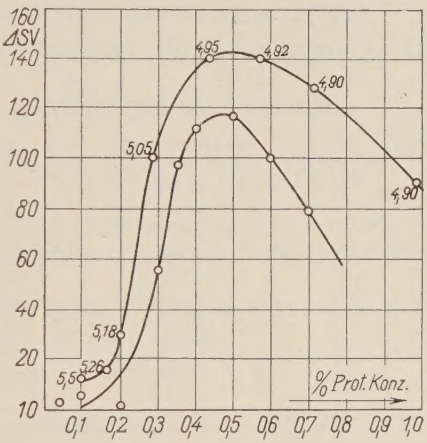

Fig. 1. ΔSV einer homodispersen Ovalbumin-Quarzsuspension in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (zugleich p_H-Angabe.

[1]) Das lässt sich auch analytisch beweisen, braucht aber wohl an dieser Stelle nicht ausgeführt zu werden.

Dies zur Erklärung für die von Versuch zu Versuch beobachtete Unterschiedlichkeit der ΔSV-Werte. Die Grösse von ΔSV hängt ausserdem von einer Reihe von Faktoren ab, die, da sie das Ergebnis nicht ändern, ausserhalb des Interesses unserer Arbeit liegen.

2. Ergebnisse der Messungen.

A. Versuche mit Ovalbumin.

a) Das ΔSV bei verschiedenen Konzentrationen.

Die Versuche wurden in der beschriebenen Weise ausgeführt. In Tabelle 1 und 2 sind zwei typische Versuchsreihen dieser Art wiedergegeben.

Die Lösungen waren durch Verdünnen der elektrodialysierten[1]) Ovalbuminlösung mit destilliertem Wasser erhalten worden.

Tabelle 1. Ausgangslösung 1·40 % Ovalbumin $p_H = 4{\cdot}90$.

Konzentration	p_H	Δ SV
0·10	5·5	12
0·16	5·26	16
0·20	5·18	29
0·28	5·05	100
0·43	4·95	140
0·57	4·92	140
0·71	4·90	187
0·99	4·90	90
1·40	4·90	—

Tabelle 2. Ausgangslösung 1·03 % Ovalbumin $p_H = 4{\cdot}90$.

Konzentration	p_H	Δ SV
0·04	6·00	3
0·10	5·47	6
0·20	5·19	1
0·30	5·02	57
0·35	4·98	97
0·40	4·96	110
0·50	4·93	116
0·60	4·91	100
0·70	4·90	77

Die Versuche zeigen, dass — unabhängig von der Ausgangskonzentration — bei einer Konzentration von etwa 0·5 % Ovalbumin das ΔSV eiweissumhüllten Quarzes einen Maximalwert erreicht. Aus der graphischen Darstellung Fig. 1 geht dies deutlich hervor. Fig. 2

[1]) Die Elektrodialyse wurde nach Ettisch, G. und de Loureiro, J. A. (Biochem. Z. **266** (1933) 422) an Ovalbumin. pur. Merck durchgeführt.

gibt die p_H-Werte einer Ovalbuminlösung bei verschiedenen Konzentrationen wieder, wie sie bei diesen Versuchen und auch bei solchen ohne Quarz gemessen wurden.

Um zu zeigen, dass man es hier mit reinen Gleichgewichtszuständen zu tun hat, wurden noch Versuche der folgenden Art angestellt: Nach Beendigung der Sedimentation einer Versuchsreihe wurde allen Röhrchen ein Teil der Lösung entnommen und durch die gleiche Menge Wasser ersetzt. Dann wurde die Suspension wieder aufgeschüttelt und von neuem sedimentiert. Es ergab sich dann eine den veränderten Konzentrationen vollkommen entsprechende Verschiebung des Maximums.

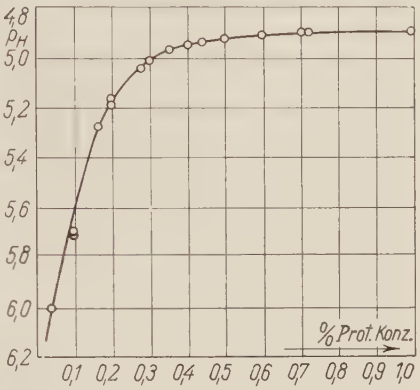

Fig. 2. Abhängigkeit des p_H einer reinen Ovalbuminlösung von der Konzentration.

Hält man daran fest, dass zum Extremwert des ΔSV das Extremum jenes Phasengrenzpotentials gehört, so müssen in unseren Versuchen die Proteinmoleküle in den Lösungen mit maximalem ΔSV verschwindende Potentialdifferenz gegen die Lösung haben. Das ist aber allein der Fall, wenn die „mittlere Wertigkeit" W null wird[1]),

$$\overline{W}^* = 0.$$

Die Ovalbuminlösung im Bereich des ΔSV-Maximums, d. h. bei 0·5 %, $p_H^* = 4{\cdot}93$ ist isoelektrisch. Der Anstieg des ΔSV bis zu dieser Konzentration stand in gutem Einklang mit den gemessenen p_H-Werten. Hier war ja $W < 0$. Sein Abfall muss jedoch gesondert gedeutet werden. Bis zu etwa 0·65 % war er noch mit dem Abfall in den p_H-Werten in Verbindung zu bringen, obwohl diese von der Proteinkonzentration unabhängig sein sollten! Es liegt hier eine klare Ladungserhöhung der Moleküle vor, hier ist offenbar $W > 0$. Die weitere Abnahme des ΔSV bei Konzentrationserhöhung erfolgt aber unter praktisch konstanter (H^+). Der Ladungszustand der Proteinmoleküle ist also von bestimmter Proteinkonzentration ab auch noch von dieser Konzentration abhängig. D. h. die „mittlere Wertigkeit" des Proteinmoleküls ist dann auch noch eine Funktion der Proteinkonzentration. Von diesem Tatbestand

[1]) Siehe Ettisch, G. und Schultz, G. V., Biochem. Z. **265** (1933) 338.

überzeugten wir uns durch Messung der kWG der Eiweiss-Quarzteilchen bei verschiedenem p_H und in verschiedenen Konzentrationen.

b) Kataphoresemessungen.

Die Messung der kWG der von Eiweiss umhüllten Quarzteilchen gestattet direkt zu beobachten, worüber die SV-Methode nur indirekte Aussagen machen konnte.

Wir verwendeten eine neu konstruierte Kammer aus flachem Glasrohr (sogenanntes Butyrometerrohr), die daher von Kittungen gänzlich frei war[1]). Ihre Brauchbarkeit wurde durch Kontrollmessungen mit reinen Quarzteilchen in reinem Wasser nachgeprüft. Der für das „ξ"-Potential durch diese Messungen ermittelte Wert stimmte gut mit den in der Literatur angegebenen Werten überein. Dieser Befund und die relativ genaue Form der erhaltenen Eichparabeln erwiesen die Verwendbarkeit der Konstruktion für unseren Zweck.

Durch die Kataphoresemessungen wollten wir in Erfahrung bringen, ob in den Lösungen mit höherer Konzentration als 0·65 % trotz gemessener p_H-Konstanz der Ladungszustand der Proteinmoleküle sich erhöht hatte.

Die Messungen wurden an sehr verdünnten Quarzsuspensionen mit Teilchen von etwa 1 bis 2 μ Durchmesser ausgeführt. Die Ergebnisse mit und ohne Pufferbeimengung sind in Tabelle 3 wiedergegeben:

Tabelle 3.

Ohne Puffer		Mit Puffer 4·93	
Konz.	U	Konz.	U
0·50	0·0	0·20	0·0
0·57	0·0	0·45	0·0
0·60	2·0	0·90	5·3
0·70	8·5	1·50	8·4
0·71	8·0	1·90	11·1
0·99	11·0	3·00	15·4

Es ist klar, dass die kWG bei gleichbleibender Feldstärke von einer Reihe von Faktoren der Lösung abhängt, die sich mit der Konzentration ändern. Legt man die Helmholtzsche Theorie zugrunde, die gegenwärtig allein verwendbare Gleichungen liefert, so kämen in Betracht die Viscosität und die Dielektrizitätskonstante. Es ist aber leicht zu zeigen, dass für den hier erörterten Effekt die Veränderungen dieser Grössen nicht in Frage kommen können[2]).

[1]) Eine solche von Kittungen freie Glaskammer hatten schon Northrop und Kunitz (J. gen. Physiol. **7** (1925) 729) angegeben. [2]) Die Niederschrift des analytischen Beweises erübrigt sich wohl an dieser Stelle.

Damit sind unsere Folgerungen aus dem „Verdünnungsversuch" bestätigt; denn: 1. Bei p_H 4·93 erfolgt bis zu gewissen (niedrigen) Konzentrationen (etwa 0·5 %) keine Wanderung der eiweissumhüllten Quarzteilchen. Das bedeutet, dass ihre mittlere Potentialdifferenz („Mittlere Ladung") gegen die Lösung Null ist, die Eiweissmoleküle sich also im IP befinden. 2. Oberhalb dieser Grenzkonzentration steigt trotz — auch ohne Puffer— sehr bald konstantem p_H die kWG bei steigender Konzentration. (Die Abweichung der Ergebnisse in Tabelle 3 mit Puffer von denen aus reinen Lösungen erklärt sich unschwer aus der Wirkung der Pufferelektrolyte auf die Aktivität.)

Während also die verdünnten Lösungen bei p_H 4·93 isoelektrisch sind, können es die konzentrierten Lösungen (oberhalb 0·5 % Ovalbumin) nicht mehr sein. Mit der Konzentration wächst die negative Ladung, der IP muss ins stärker saure Gebiet verschoben sein. Oberhalb 0·5 % ist also der IP von Ovalbumin auch hiernach eine Funktion der Konzentration.

Das Ausmass des in Tabelle 1 und 2 mitgeteilten ΔSV-Effektes berechtigt zu der Folgerung: Die ΔSV-Methode gestattet eine so empfindliche Bestimmung des IP, dass damit selbst eine geringfügige Veränderung dieser charakteristischen molekularen Konstante durch direkte Messung festgestellt werden kann.

Zuvor wäre jedoch zu entscheiden, ob die Veränderung alle Proteinmoleküle betrifft, also auch die der Lösung, oder ob nicht etwa durch Veränderungen bei der Adsorption die Erhöhung des Ladungszustandes der Proteinmoleküle hervorgerufen ist; denn eine solche Möglichkeit ist ja weiter oben ausdrücklich erwähnt, wenn auch hier als wenig wahrscheinlich bezeichnet worden. Wir nahmen daher die Adsorptionsisotherme Quarz—Ovalbumin auf.

c) Die Adsorptionsisotherme Quarz—Ovalbumin und ihre weitere Bedeutung.

Je 5 g Quarzpulver und 25 cm³ Ovalbuminlösung verschiedener Konzentration werden miteinander verrührt. Nach Sedimentation des Quarzpulvers wurde die Abnahme der Konzentration in der überstehenden Lösung bestimmt und daraus die adsorbierte Menge berechnet. Das Ergebnis der Messungen ist in Tabelle 4 mitgeteilt.

Tabelle 4.

Konzentration in %	0·2	0·4	0·6	0·8	1·0	1·5	2·0
Adsorbierte Menge in mg	7·8	8·1	6·8	8·2	8·4	7·9	8·1

Es geht klar daraus hervor: 1. Absorptionssättigung findet in unseren Versuchen bei relativ niedrigen Eiweisskonzentrationen ($< 0{\cdot}2\,\%$) statt. 2. Unser Effekt tritt in dem Konzentrationsbereich auf, in dem längst Adsorptionssättigung vorliegt. 3. Die Sättigungsmenge ist unabhängig von Konzentration und Zustand der Lösung. Unser Effekt hat daher grundsätzlich mit dem Adsorptionsvorgang nichts zu tun. Daher muss für unsere Versuche auch die Annahme verworfen werden, dass der Effekt etwa von der Wechselwirkung der adsorbierten Molekülе herrührt. Dagegen ist thermodynamisch sofort einzusehen, dass der Zustand der Moleküle in der Adsorptionsschicht sich — auch oberhalb der Sättigung — ändern muss, sobald der Zustand der Moleküle (von der gerade beobachteten Art) in der flüssigen Phase sich ändert. Zwischen der flüssigen Phase und der adsorbierten besteht ein thermodynamisch bestimmter Gleichgewichtszustand nur für Moleküle derselben Art. Der Zustand der adsorbierten wird daher vom Zustand der gelösten Moleküle (derselben Art) wesentlich, aber nicht vollkommen bestimmt. Daraus ergibt sich aber der wichtige Schluss, dass Konfigurationsänderungen gelöster Proteinmoleküle an adsorbierten verfolgbar sind, auch wenn sie nicht aus groben chemischen Reaktionen hervorgehen, wie etwa Absättigung saurer oder basischer Valenzen usw. Ja, es kann sich sogar um solche handeln, die — wie hier — nicht einmal an der Isotherme erkennbar sind. Man wird demnach die Wechselwirkungseffekte unter den gelösten Molekülen an den adsorbierten in grosser Annäherung wiederfinden — als Wechselwirkung zwischen gelösten und adsorbierten Teilchen. Mit diesen Darlegungen ist aber zweierlei nicht behauptet. Nämlich: 1. dass bei der Adsorption die Eiweissmoleküle grundsätzlich nicht verändert werden sowie 2. dass die Wechselwirkung zwischen gelösten Molekülen völlig identisch ist mit der zwischen gelösten und adsorbierten. D. h. aber nichts anderes als: 1. auch hier wird mit dem Eintritt eines unter einem Wechselwirkungspotential stehenden Moleküls der Lösung in den Adsorptionsraum eine gewisse Veränderung an ihm eintreten müssen. Über ihren Betrag aber kann damit nichts ausgesagt sein. Sicherlich ist er zu vernachlässigen in bezug auf den Effekt, um den es sich hier handelt. 2. Der von uns mitgeteilte Effekt ist auch wesentlich unabhängig von den eventuellen Veränderungen, die das Molekül bei der Adsorption erfährt.

Diesen Darlegungen lagen durchgehends Gleichgewichtsvorstellungen zugrunde. Nun ist aber schon von W. Biltz[1]), Ramsden[2]) u. a. gezeigt worden, dass die Adsorption von Proteinen irreversibel erfolgt. In diesem Falle müsste allerdings jene Grundlegung ihren Sinn verlieren. Kürzlich gingen Lindau und Rhodius[3]) in ihrer Arbeit von Vorstellungen aus, die zweifelsohne die Existenz von echten Gleichgewichten voraussetzen. Sie gelangen aber andererseits — wie schon viele Autoren vor ihnen — zur Auffassung von der Nichtumkehrbarkeit, ohne dieses eigenartigen Umstandes irgendwie Erwähnung zu tun. Uns scheinen aber alle bisherigen Irreversibilitätsversuche keine strenge Beweiskraft zu besitzen. vor allem nicht mit Rücksicht auf die neue Theorie der Eiweisslösungen[4]), die zum Teil übrigens — nämlich in den Raumbeanspruchungsversuchen — von Lindau und Rhodius eine schätzenswerte Bestätigung erfuhr.

Für unsere Erscheinung ist indessen die Frage ohne wesentliche Bedeutung, ob die Eiweissadsorption einen echten Gleichgewichtsvorgang darstellt oder nicht. Das ging — siehe weiter oben — schon aus der Feststellung hervor, dass die Erscheinung unabhängig ist von der speziellen Natur des Adsorptionsvorganges. Die vorliegende „Isotherme" wäre dann lediglich anders zu deuten, ohne dass indes dadurch für diejenigen Folgerungen Schwierigkeiten entstünden, die für die Interpretation unserer Versuchsergebnisse notwendig sind. Wir möchten also hier keineswegs für die Reversibilität der Proteinadsorption eintreten, halten vielmehr diese Frage noch für ungeklärt. Sie ist dessenungeachtet darum von besonderer Wichtigkeit, weil nach unserer Meinung die Feststellung der Irreversibilität die Notwendigkeit einer eingehenden Analyse des Adsorptionsvorganges einschliesst. Wahrscheinlich sind dann hier zwei grundsätzlich verschiedene Vorgänge mit weit auseinanderliegenden Geschwindigkeitskonstanten im Spiele.

d) Bestimmung des isoelektrischen Punktes von Ovalbumin (Eiweisskonzentration als Parameter).

Trägt man die nach dem oben geschilderten Verfahren erhaltenen ΔSV-Werte gegen das Gleichgewichts-p_H auf, so ergibt sich der IP aus dem Maximum der ΔSV-Kurve. Die Werte sind untereinander

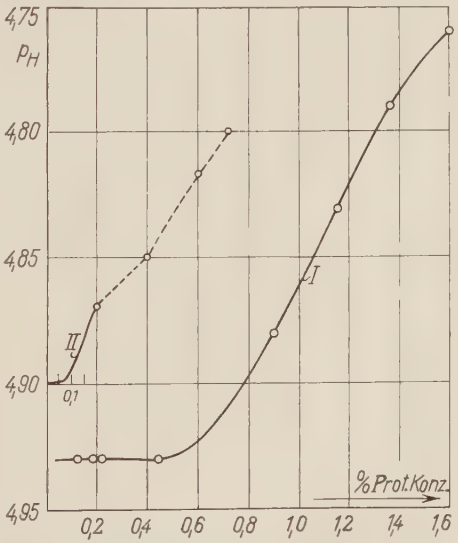

Fig. 3. Abhängigkeit des IP von der Konzentration bei Ovalbumin (Kurve *I*).

[1]) Biltz, W., Biochem. Z. **23** (1910) 27. [2]) Ramsden, loc. cit. [3]) Lindau, G. und Rhodius, Z. physik. Chem. (A) **172** (1935) 321. [4]) Siehe hierzu die eingangs angeführten Arbeiten von Ettisch und von G. V. Schulz.

exakt vergleichbar, wenn sie auch, entsprechend unseren Darlegungen, mit einem — wahrscheinlich verschwindenden — Fehler behaftet sein werden. Die schliesslich mitgeteilte Abhängigkeit des IP von der Eiweisskonzentration, die dann den $\Delta SV(p_H)$-Kurven entnommen wurden, entspricht also in ihrem Verlauf den wirklichen Verhältnissen. Die Werte findet man in Tabelle 5.

Diese direkten IP-Bestimmungen ergeben nochmals die schon aus den früheren Beobachtungen gefolgerte Abhängigkeit des IP von der Eiweisskonzentration. In Fig. 3 ist diese Abhängigkeit dargestellt. Ein Vergleich mit Fig. 2 zeigt, dass die kritische Konzentration, von der aufwärts der IP des Ovalbumins sich zu kleineren p_H-Werten verschiebt, etwa zusammenfällt mit der Konzentration, von der abwärts diese reine Eiweisslösung ihr p_H zu ändern beginnt. Derartiges war durchaus zu erwarten.

Tabelle 5.

Die Abhängigkeit des IP von Eiweisskonzentration bei Ovalbumin.

Konzentration in %	0·135	0·195	0·21	0·45	0·90	1·13	1·35	1·60
IP	4·93	4·93	4·93	4·93	4·88	4·83	4·79	4·76

B. Versuche mit Serumalbumin.

a) Vorbemerkungen.

Eine Reihe von Messungen, die denen mit Ovalbumin entsprachen, führten wir am Albumin aus Rinderserum durch. Der einzige uns bekannte Autor, Soerensen[1]), der Bestimmungen des IP von Albumin bei verschiedenen Konzentrationen ausgeführt hat, findet allerdings in den verdünnten Lösungen einen IP, der von dem konzentrierterer abweicht. Die Streuung zwischen gleichen Bestimmungen ist aber bei ihm so erheblich, dass er schreibt: „. . . und theoretisch genommen sollen selbstverständlich alle diese Punkte zusammenfallen. Wenn das nicht der Fall ist, dann ist die Ursache lediglich Versuchsfehler, die überdies bei dem benutzten grossen Masstab besonders stark hervortreten".

b) Das p_H einer reinen Serumalbuminlösung in Abhängigkeit von der Konzentration.

Bei Ovalbumin bestand zwischen der p_H-Abhängigkeit von der Konzentration und der Konzentrationsfunktion des IP ein enger

[1]) Soerensen, Proteinstudien. Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **103** (1914).

Zusammenhang. Nunmehr wurden reine Serumalbuminlösungen[1]) von verschiedenen Ausgangskonzentrationen hergestellt und mit steigenden Mengen destillierten Wassers verdünnt. In einem Falle (II) verwandten wir als Ausgangslösung eine nicht vollkommen zu Ende dialysierte Serumalbuminlösung vom p_H 3·80. Sie machte jedoch beim Verdünnen einen gleichartigen p_H-Verlauf durch, wie eine typische, vollkommen reine, elektrolytfreie Lösung (I). Die Ergebnisse der Messungen sind in Fig. 4 wiedergegeben.

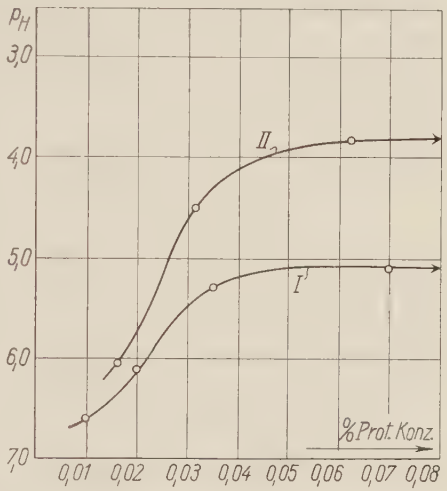

Fig. 4. Abhängigkeit des p_H einer reinen (Kurve *I*) und einer schwach sauren (*II*) Serumalbuminlösung von der Konzentration.

Sie zeigen, dass die „Grenzkonzentration", die bei Ovalbumin bei etwa 0·5% liegt, bei Serumalbumin einen um eine ganze Zehnerpotenz niedrigeren Wert besitzt. Der Wert der kritischen Konzentration ist hier 0·05 bis 0·06%. Der Zusatz von Elektrolyt in den hier vorhandenen Mengen vermag den Vorgang selbst nicht zu beeinflussen. Oberhalb dieser „Grenz"-Konzentration ändert eine reine Serumalbuminlösung ihr p_H nicht mehr wesentlich. Bei Ovalbumin lag das „zugehörige" p_H der reinen konzentrierten Lösung sehr nahe dem IP. Die Verhältnisse bei Serumalbumin lehren, wie sich auch theoretisch verstehen lässt, dass dieses keineswegs notwendig ist. Das p_H einer vollkommen reinen Serumalbuminlösung oberhalb der Grenzkonzentration ist 5·16. Es scheint, als ob das Molekulargewicht,

[1]) Die Darstellung geschah aus frischem Rinderserum so, wie sie Ettisch und Schulz (Biochem. Z. **265** (1933) 338) angegeben haben, nur wurde hier die Elektrodialyse nach Ettisch und de Loureiro (loc. cit.) angewendet. Die elektrolytfreie Lösung wurde durch Zentrifugieren von Trübungen befreit und im Vakuum bei 0° bis 5° C eingetrocknet. Das gelblich-weisse Präparat besass schuppig kristallines Aussehen, war in Wasser leicht löslich, selbst noch nach Monaten. Das p_H des wiedergelösten Albumins stimmte vollkommen mit dem der ehemaligen Lösung überein (in Gegenwart von CO_2: p_H 5·28).

obgleich hier sicher von Bedeutung, nicht ausreicht, eine Erklärung für dieses Verhalten zu liefern, sondern dass die besondere Natur der gerade dissoziierten Gruppenart des Serumalbumins gegenüber der des Ovalbumins hierfür noch in Betracht kommt.

c) Die Adsorptionsisotherme Serumalbumin—Quarz.

Es musste also damit gerechnet werden, dass beim Serumalbumin die Verschiebung des IP schon bei sehr niedrigen Konzentrationen (0·05 bis 0·06 %) einsetzt. Die exakte Ausmessung der Adsorptionsisotherme war daher notwendig zur genauen Kenntnis der Sättigungskonzentration sowie auch aus den Gründen, die beim Ovalbumin auseinandergesetzt worden waren. Die Messungen sind nach dem gleichen Prinzip durchgeführt worden, wie bei Ovalbumin. Die Resultate zeigt Fig. 5.

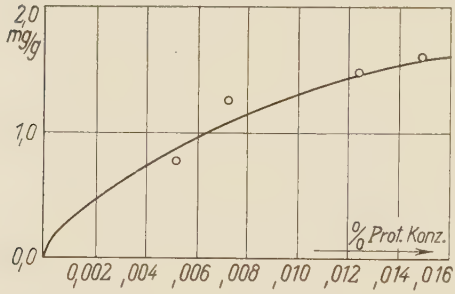

Fig. 5. Die Adsorption von Serumalbumin an Quarz.

Aus ihr geht hervor, dass ab 0·015 % Serumalbumin-Gleichgewichtskonzentration Adsorptionssättigung eingetreten ist. Die von 5 g unseres Quarzpulvers adsorbierte Menge beträgt 8·0 mg. Wir konnten also ohne Gefahr Messungen des IP unterhalb der „Grenzkonzentration" (0·05 %) mittels der ΔSV-Methode ausführen. Im übrigen gilt das für Ovalbumin Ausgeführte auch hier.

d) Bestimmung des IP von Serumalbumin (Eiweisskonzentration als Parameter).

Das Fehlen einer beim Ovalbumin sehr lästigen Oberflächenkoagulation erleichterte die entsprechenden Untersuchungen bei Serumalbumin erheblich. Die erhaltenen Werte der IP (C)-Funktion (C = Eiweisskonzentration in %) sind in Tabelle 6 zusammengefasst und in Fig. 6 dargestellt. Genau so wie beim Ovalbumin (siehe 2 A d) wurden sie den successiven Δ SV (p_H)-Kurven entnommen.

Tabelle 6.

Der IP von Serumalbumin bei verschiedenen Konzentrationen.

Konzentration	0·02	0·03	0·05	0·20	0·40	0·60	0·70
IP	4·90	4·90	4·90	4·87	4·85	4·82	4·80

Die Ergebnisse zeigen, dass auch hier die Grenzkonzentration der IP (C)-Funktion von der Grenzkonzentration der p_H (C)-Funktion der reinen Serumalbuminlösung nur um Geringes entfernt ist[1]).

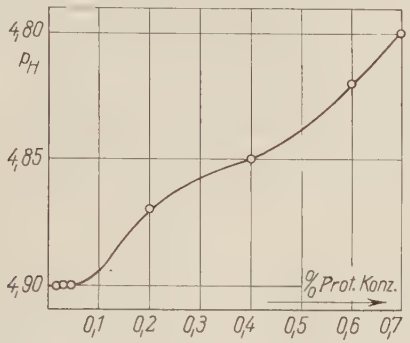

Fig. 6. Abhängigkeit des IP von der Konzentration bei Serumalbumin.

Aus diesen experimentellen Feststellungen folgt, dass man bei dem vielatomigen Elektrolyten: Proteinlösung — genau wie bei den wenigatomigen Ionenlösungen - zwei Konzentrationsgebiete unterscheiden muss, will man die Gesetzmässigkeiten dieser Lösungen in Erfahrung bringen, nämlich:

1. Ein Gebiet, wo mit der thermodynamischen Konzentration gerechnet werden kann;

2. ein Gebiet, wo in die Gesetze eine besondere Aktivitätsfunktion eingeht.

III. Theoretischer Teil.

A.

Für den IP gilt ganz allgemein von der mittleren Wertigkeit $\bar{W}^*$ des Proteinmoleküls

$$\bar{W}^* = \frac{\int_0^V (m/M)\left(\sum_1^i a^+_{(\mu)} - \sum_1^k a^-_{(\nu)}\right) \Delta\tau}{\int_0^V (m/M)\,\Delta\tau} = 0, \qquad (1)$$

wo m die Masse pro Volumenelement $\Delta\tau$ ist, M das Molekulargewicht, a^+ die Aktivität der μ-ten positiv geladenen Gruppe eines Proteinmoleküls, $a^-_{(\nu)}$ dasselbe für die ν-te negative. Die mittlere Wertigkeit ist hier Null, das Molekül besitzt für sehr verdünnte Lösungen keine freie

[1]) Siehe Ettisch und Schulz, G. V., Biochem. Z. **265** (1933) 338.

Ladung. Ferner sind die NH_2-Gruppen des Albuminmoleküls am IP vollständig dissoziiert, die $\overset{\diagup OH}{C=O}$—Gruppen dagegen nicht. Es gilt also für unseren Fall am IP zugleich mit (1) für den Dissoziationszustand D^+:

$$D^{+}* = \frac{\int_0^V (m/M)\,\mathfrak{N}\,\frac{\partial \sum_1^i z^{+}_{(\mu)}}{\partial (H^{+})}\,\mathrm{d}\tau}{\int_0^V (m/M)\,\mathfrak{N}\,\mathrm{d}\tau} = 0, \tag{2}$$

für D^- dagegen:

$$D^{-}* = \frac{\int_0^V (m/M)\,\mathfrak{N}\,\frac{\partial \sum_1^k z^{-}_{(\nu)}}{\partial (OH^{-})}\,\mathrm{d}\tau}{\int_0^V (m/M)\,\mathfrak{N}\,\mathrm{d}\tau} = -\varepsilon < 0, \tag{3}$$

wo $\sum z^{+}_{(i)}$ die Summe aller i positiven Ladungen ist, die das einzelne Proteinmolekül entwickeln kann, $\sum z_{(k)}$ die aller k negativen. In sehr verdünnter Lösung ist aber, siehe (1):

$$\left.\begin{aligned} a^{\pm} = f^{\pm} \cdot c^{\pm} = c^{\pm}; \\ f^{+} = f^{-} = 1. \end{aligned}\right\} \tag{2a}$$

denn

Wird die Konzentration an Protein grösser, der mittlere Molekülabstand klein genug, so kann das Molekül am IP nicht mehr als ladungsfrei angesehen werden. Die in gleicher Zahl vorhandenen — siehe (1) bzw. (2a) — positiven und negativen, dissoziierten Gruppen bilden einen Polypol. Die Moleküle erlangen dann eine potentielle elektrostatische Energie aufeinander, deren statistischer Mittelwert hier nicht verschwinden kann. Bestehen doch besondere Bedingungen hinsichtlich der gegenseitigen Lagerung der Proteinpolypole. Hierbei sind die Anordnungen mit stärkster Energieabnahme bevorzugt. Für das Proteinmolekül im IP bedeutet das: möglichste Annäherung der NH_3^+- und $\overset{\diagup O^-}{C-O}$-Gruppen verschiedener Moleküle. (In zweiter Linie, bei noch höheren Konzentrationen, findet dasselbe auch mit anderen Gruppen statt, nämlich mit denen, die Dipolcharakter haben. Steigerte man die Konzentration noch weiter, so müssten auch noch weitere, bekannte Wechselwirkungsenergien berücksichtigt werden.) Wird bei diesem Ordnungsvorgang die mittlere Energie ψ

frei, so ist die Wahrscheinlichkeit w dieses Zustandes für das Volumenelement $\Delta\tau$

$$w\,\Delta\tau = w_0 e^{\psi/kT}\Delta\tau, \tag{4}$$

wo w_0 die für $\psi = 0$ ist, also dem Zustand bei verschwindender potentieller elektrostatischer Energie entspricht. w kann auch als Zahl der Teilchen je Volumenelement $\Delta\tau$ bezeichnet werden, falls hier die mittlere potentielle Energie ψ herrscht, die wiederum eine Funktion des mittleren Wechselwirkungspotentials φ der Teilchen darstellt. w_0 ist dann die bei $\varphi = 0$, also auch $\psi = 0$, also bei Gleichverteilung vorhandene Zahl, d. h. aber die stöchiometrische Konzentration. Für ψ im Ganzen ist etwa massgeblich — ausser φ — die Grösse der Ladung, die Konzentration sowie die Dielektrizitätskonstante. Für wenigatomige Elektrolyte gibt die Theorie von Debye und Hückel die explizite Abhängigkeit, für Proteinmoleküle ist das noch nicht möglich, doch wird der Debyesche Term wohl zeigen, worauf es im Grunde hierbei ankommt. Man darf behaupten, dass die Möglichkeit der explititen Ermittlung von ψ uns in der Erkenntnis der Eigenschaft der Proteinlösungen ein erhebliches Stück vorwärtsbringen würde. Doch darf nicht ausser acht gelassen werden, inwiefern bei Proteinmolekülen — besonders am IP — noch besondere Verhältnisse herrschen, die von denen wenigatomiger Elektrolytmoleküle abweichen (siehe weiter unten).

B.

Die vorliegende Arbeit löste eine Aufgabe, die die experimentelle Ergänzung zu der noch ungelösten eben erörterten theoretischen darstellt. Es wurde nämlich die Grenze bestimmt, bis zu welcher bei endlichen Konzentrationen die Gesetze der Lösungen in einfachster Form anwendbar sind. D. h. aber: Im Ausdruck für das thermodynamische Potential der Lösung Γ kann oberhalb dieser Grenze nicht mehr für die Aktivität der Molenbruch c treten. Es gilt nicht mehr, wie unterhalb jener Grenze:

$$\Gamma_{\mathrm{id}} = \sum n_i (\varkappa_i + kT \ln c_i), \tag{5}$$

sondern

$$\Gamma_{\mathrm{re}} = \sum n_i (\varkappa_i + kT \ln h_i \cdot c_i), \tag{6}$$

wo h_i das bezügliche Aktivitätspotential bedeutet, das durch das Wechselwirkungspotential wesentlich bestimmt ist. Unter solchen Umständen leitet sich also das molekularkinetische Äquivalent für die thermodynamische Potentialverringerung — denn es ist zunächst $h_i < 1$ — aus den gegenseitigen Einwirkungen der polaren Gruppen her.

Unsere Versuchsergebnisse mögen die Unterscheidung von idealen (vollkommenen) und realen (wirklichen) Eiweisslösungen rechtfertigen, die besondere Art der hier mitgeteilten Resultate ist damit noch nicht gedeutet. Solchen Ausführungen aber müssen einige Hinweise vorausgeschickt werden, die die eigenartige Natur der Proteinmoleküle — insbesondere am IP — charakterisieren, damit nicht etwa der Eindruck entsteht, sie sollten — oder könnten — ohne weiteres den wenigatomigen Elektrolyten gleichgesetzt werden.

Zunächst wird schon der grosse Unterschied in den Molekulargewichten dazu zwingen, jene Grenze für jeden besonderen Eiweisskörper gesondert aufzusuchen. Dabei wird man naturgemäss recht erhebliche Unterschiede bei den Proteinen finden. Eigenartig wird ferner die Temperaturabhängigkeit sein müssen, denn ψ bzw. φ wirkt ja kT entgegen. Zu dem üblichen Temperatureffekt bei kleinen Ionen kommt hier, bei den Teilchen vom Molekulargewicht etwa 10^5 ein weiterer. Die neue Theorie der Eiweisslösungen[1]) verlangt, da die erhöhte Energie der Wärmebewegung die Abstände der Atome und Atomgruppen vergrössern muss, von gewissen kT-Werten an, eine merkliche Erhöhung der Raumbeanspruchung der Proteinmoleküle. Bei weiterer Erhöhung der inneren Energie des Moleküls sind neue, noch weitergreifende Effekte zu erwarten. So z. B. Änderungen der Dissoziation und sogar reversible Spaltungen. In mässigen Grenzen gehalten, wird bei Temperaturerhöhung dem rein gaskinetischen Effekt durch die vergrösserte Raumbeanspruchung entgegengewirkt, so dass zwischen beiden — äusserlich — ein gewisser Ausgleich eintreten sollte. Aus äusseren Gründen konnten wir leider Untersuchungen hierüber nicht durchführen; wir wollten daher nur kurz auf diese Dinge hingewiesen haben. Besonders charakteristisch für die hier vorliegenden Verhältnisse erscheint uns aber das Folgende: die Pole des Polypols sind hier — am IP — die dissoziierten Gruppen. Für ihre Ladung wird man von gewissen mittleren Entfernungen ab, also oberhalb gewisser Konzentrationen, in erster Näherung die der freien Ionen in Rechnung setzen dürfen. Bei grösseren Entfernungen, also niederen Konzentrationen wird sich der Polypol elektrisch ladungsfrei darbieten, d. h. es werden sich dann im Mittel positive und negative Ladungen am Aufpunkte aufheben. D. h. aber: ein Wechselwirkungspotential φ wird relativ plötzlich oberhalb einer bestimmten Konzentration auftreten können. Ferner ist beachtenswert, dass die freien Ladungen am IP keine Ionenwolke besitzen, also keine Kompensationsschicht. Hier liegt ja beim Proteinmolekül eine Art innerer Ionisation vor. Auch dieser Umstand, den wenigatomigen Elektrolyten fremd, wird jenen Zustand: $\psi = 0$ besonders scharf auffinden helfen.

C.

Die durch (4) bzw. (6) festgelegten Wirkungen gehen aber über die blossen Ordnungsvorgänge hinaus. In der Hauptsache werden bei der oben beschriebenen Annäherung der Moleküle die NH_3^+-

[1]) Siehe Ettisch und Schulz, G. V., loc. cit.

Gruppen des einen beim anderen eine Erniedrigung der Affinität der $C{=}O^{-}$-Gruppen zum Proton hervorrufen müssen, also deren Dissoziationszustand erhöhen. In schwächerem Masse werden die NH_3^{+}-Gruppen den Dissoziationszustand der NH_3^{+}-Gruppen des anderen Moleküls erniedrigen. Diese letzte Wirkung wird aber überkompensiert durch die Wirkung der grösseren Nähe der $C{=}O^{-}$-Gruppen des ersten Moleküls gegenüber den NH_3^{+}-Gruppen des zweiten. In schwachem Masse werden aber auch die $C{=}O^{-}$-Gruppen des einen Moleküls die Dissoziation derselben Gruppenart beim anderen Molekül heruntersetzen müssen. Derartige Hauptwirkungen werden zwischen allen Molekülen von genügend kleinem Abstand bestehen. Bei den Karboxylgruppen ist nun nach (3) die Möglichkeit zur Vermehrung der Zahl der geladenen Gruppen (hier als Folge der Wechselwirkungen) gegeben, wenn $p_H^* < 7{\cdot}0$ ist. Bei den NH_3^{+}-Gruppen ist dieses dann wegen des Molekülzustandes (IP!) nicht mehr möglich infolge von (2). Ist dagegen $p_H^* > 7{\cdot}0$, dann können wohl noch NH_2-Gruppen ein Proton aufnehmen, es sind aber keine $COOH$-Gruppen mehr vorhanden, die eines abgeben könnten. Hier, bei Ovalbumin und Serumalbumin liegt der Fall $p_H^* < 7{\cdot}0$ vor. Die NH_3^{+}-Gruppen erfahren unter der Wechselwirkung allein eine Aktivitätsverminderung. Das Wechselwirkungspotential der isoelektrischen Moleküle führt also hier zu einer Erhöhung des Dissoziationszustandes des „sauren Molekülanteils" und einem Aktivitätsverlust des alkalischen. Bei diesem Vorgang muss das Molekül aus seinem IP herauskommen. Die Zahl der dissoziierten Karboxylgruppen ist ja grösser geworden als die der Aminogruppen. Es ist dann:

$$\overline{W} < 0; \quad \overline{W} = |\lambda| \; . \tag{7}$$

Das ΔSV-Maximum muss also hier bei $\psi \neq 0$ nach niederem p_H-Wert verschoben werden[1]). Die kWG der eiweissumhüllten Quarzteilchen — genau so wie die der freien Eiweissmoleküle — ist nicht

[1]) Es bedarf wohl kaum noch der weiteren Ausführung, dass das gleiche geschehen müsste, wenn $p_H^* > 7{\cdot}0$ wäre. Nur erfolgt dann die Herabsetzung der Aktivität an den sämtlichen dissoziierten sauren, die Erhöhung des Dissoziationszustandes an den nicht vollständig dissoziierten NH_2-Gruppen [siehe hierzu (3)]. Das p_H^* ist dann nach höherem p_H-Werte verschoben.

mehr Null, sondern zur Anode gerichtet, da die „mittlere Wertigkeit" und damit erst der weiter oben charakteristische Potentialsprung — siehe (7) — von Null verschieden ist. Die Gleichgewichts-(H^+) ist erhöht. Alles das zeigen auch unsere Versuche.

D.

Für diese Folgeerscheinungen der Wechselwirkung nach Konzentrationserhöhung gibt es eine Grenze. Sie liegt am Bereich maximaler Dissoziation des Moleküls. Also dort, wo für den Fall $p_H^* < 7{\cdot}0$ auch alle $\overset{\diagup OH}{C}{=}O$-Gruppen neben den NH_2-Gruppen dissoziiert sind. Hier gilt also mit Rücksicht auf (2) bzw. (3):

$$V^0 = D^{+0} - D^{-0} = \frac{\int\limits_0^V (m/M)\,\mathfrak{N}\left(\frac{\partial \sum\limits^{i} z^+_{(\mu)}}{\partial (H^+)} - \frac{\partial \sum\limits^{k} z^-_{(\nu)}}{\partial (OH^-)}\right) \Delta\tau}{\int\limits_0^V (m/M)\,\mathfrak{N}\,\Delta\tau} = -k^0\ ^{1)}. \qquad (8)$$

V^0 ist die „mittlere Hauptladungszahl", eine charakteristische Konstante des Moleküls. Bei fortgesetzter Abstandsverminderung der Moleküle, also bei Konzentrationserhöhung müssen sich aber weitere Effekte hinzugesellen. Die infolge der Konzentrationserhöhung zunehmende (H^+) wird bald in merkliche Wechselwirkung mit den $\overset{\diagup O^-}{C}{=}O$-Gruppen treten und nunmehr auch deren Aktivität erniedrigen. Das wird zu einer Abschwächung des bisherigen Anstieges der $p_H[(c_{\text{Prot}})]$-Kurve und auch der $p_H^*(c_{\text{Prot}})$-Kurve führen müssen. Diesen Vorgang scheint Fig. 3 sowohl für Ovalbumin wie für Serumalbumin in einer Konkavität nach der c_{Prot}-Achse anzuzeigen[2]).

E.

Wirken auf das Eiweissmolekül vollständig dissoziierte, wenigatomige Neutralsalze, so muss ein entsprechender Mechanismus in Gang kommen. Bei geringen Salzmengen kann kein merklicher

[1]) Alle Grössen die für den „Bereich maximaler Dissoziation" gelten, sind zum Zwecke der kürzeren Fixierung mit einem ^{0} versehen; z. B. p_H^0 ist hier etwa 6·0. Naturgemäss ist hier $D^{+0} = D^{+*}$, da $p_H^* < 7{\cdot}0$. [2]) Beide sind in übereinstimmendem Masstab gezeichnet. Bei Kurve II, für Serumalbumin, entspricht der ausgezogene Anteil dem Konzentrationsbereich, in dem I (Ovalbumin) ausgeführt ist.

Effekt eintreten, da die Wechselwirkungsenergien zu gering sind. Der IP solcher Lösungen bleibt konstant. Bei grösseren Zusätzen z. B. von $NaCl$ dagegen konnten SOERENSEN und SLADEK[1]) beim Casein eine Verschiebung des p_H^* nach höheren (H^+)-Werten nachweisen (Löslichkeitsminimum). Sie erklärt sich auf genau die gleiche Weise aus der anfänglichen Wirkung der Na^+-Ionen auf die — noch undissoziierten — $C{<}^{OH}_{=O}$-Gruppen des Caseins, während die Cl^--Ionen die Aktivität der NH_3^+-Gruppen herabsetzen. Die absolute Grösse des Effektes gibt natürlich zunächst (8) an, d. h. sie ist zunächst davon abhängig, wie gross der Überschuss der einen Ladungsart ist.

[1]) SOERENSEN, S. und SLADEK, Kolloid-Z. **49** (1929) 16.

Lebenslauf.

Am 11. März 1910 wurde ich, Robert Havemann, zu München als Sohn des Hauptschriftleiters Dr. Hans Havemann und seiner Frau Elisabeth, geb. von Schönfeldt, geboren. Nach Besuch des Realgymnasiums zu Hannover und der Oberrealschule zu Bielefeld erhielt ich Ostern 1929 das Zeugnis der Reife. Ich beschloss, mich dem Studium der Chemie zu widmen. Nachdem ich drei Semester in München studiert hatte, bestand ich den ersten Teil des Verbandsexamens. Nach einem weiteren Semester in München begab ich mich zur Beendigung meines Studiums an die Universität Berlin, wo ich im Mai 1932 den zweiten Teil des Verbandsexamens ablegte. Im Herbst 1932 begann ich mit der Ausführung der vorliegenden Dissertation am Kaiser-Wilhelm-Institut für physikalische Chemie und Elektrochemie in Berlin-Dahlem im Laboratorium von Prof. Freundlich. Ich schloß die Arbeit ab im Mai 1933.

Meine Lehrer waren in München die Herren Professoren Wieland, Prandtl, Hönigschmidt, Schmidt, Fajans und Fischer; in Berlin die Herren Professoren Schlenk, Bodenstein, Freundlich, Haber, Nernst, Ettisch und Köhler.

Druck von Breitkopf & Härtel in Leipzig.